



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

海洋性中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* における無機炭素輸送体の探索

著者	中井 悠太
発行年	2017
URL	http://hdl.handle.net/10236/00027085

海洋性中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* における

無機炭素輸送体の探索

関西学院大学大学院理工学部理工学研究科

生命科学専攻 松田研究室 中井 悠太

海洋性珪藻は、地球全体の炭素固定量の約 20%を担う重要な一次生産者である。また、現在の大気圧環境下における溶存 CO_2 濃度は珪藻にとって不十分である。そこで海洋性珪藻は、無機炭素不足を解消するために、溶存無機炭素 (Dissolved inorganic carbon, DIC) を能動的に細胞内に取り込み、RubisCO 周辺の CO_2 濃度を高める無機炭素濃縮機構 (CO_2 -concentrating mechanism, CCM) を発達させた。この CCM の働きにより、珪藻は無機炭素に対して高い親和性を示す。珪藻では、無機炭素輸送体と炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase; CA) を用いて無機炭素を濃縮する Biophysical CCM が機能している。無機炭素輸送体は、DIC を細胞内に取り込みを支える重要な因子である。海洋性羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* では細胞膜及び葉緑体 4 重膜上の無機炭素輸送体が DIC を取り込み、葉緑体内部の CA によって HCO_3^- が CO_2 に変換され、RubisCO に供給されると考えられている。一方、海洋性中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* では、細胞外に局在する CA (δ -CA1、 ζ -CA1) が HCO_3^- から膜透過性を持つ CO_2 に変換し、細胞膜を透過させることで無機炭素の取り込みを行う。取り込まれた CO_2 は、細胞内の CA によって HCO_3^- に変換され、*P. tricornutum* と同様に葉緑体 4 重膜上の無機炭素輸送体が DIC を取り込み、葉緑体内部の CA によって HCO_3^- が CO_2 に変換され、RubisCO に供給されると考えられている。*T. pseudonana* の CCM は、細胞内外の CA と葉緑体 4 重膜上の無機炭素輸送体によって支えられている。現時点で、*T. pseudonana* の CA の局在は明らかになって来ているが、無機炭素輸送体についてはほとんど分かっていない。本研究では、*T. pseudonana* における無機炭素輸送体候補の細胞内局在及び機能を解析し、海洋性珪藻の炭素獲得機構を解明することを目的とした。*T. pseudonana* における無機炭素輸送体候補の細胞内局在及び機能解析をするために、BLAST 検索で *T. pseudonana* における無機炭素輸送体のオルソログを探索した。その結果、無機炭素輸送体候補として Formate nitrite transporter (FNT) ファミリー 1 つ (TpFNT) と Solute carrier (SLC) 4 ファミリー 3 つ (TpSLC4-1, 2, 3) が得られた。次に、各候補の輸送基質を予測するために、各候補の系統樹を作成した。その結果、TpFNT や TpSLC4-2 は HCO_3^- を輸送し、TpSLC4-1 はホウ酸 (H_3BO_3) を輸送することが予測された。また、各候補の細胞内局在を明らかにするために、それぞれの全長アミノ酸配列と EGFP を連結したタンパク質の局在を解析した。その結果、細胞膜上に TpSLC4-1、葉緑体の 4 重膜の外側 2 枚 Chloroplast endoplasmic reticulum (CER) のいずれかに TpSLC4-3、内側 2 枚 Chloroplast envelope (CE) のいずれかに TpFNT と TpSLC4-2 が局在することが分かった。また、 CO_2 濃度の変化による mRNA 蓄積量を比較したところ、全ての遺伝子が定常的に発現した。さらに、CE 局在の TpSLC4-2 に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 連結タンパク質 (TpSLC4-2:EGFP) 発現クローンを過剰発現体として扱い、過剰発現による生育の影響を調べたが、野生株 (Wild type, WT) との顕著な差は得られなかった。また、これらの過剰発現体の光合成活性も調べたが、WT との顕著な差は得られなかった。さらに、膜不透過性の CA 阻害剤 acetazoleamide (AZA) を用いて、細胞外 CA を特異的に阻害することで、細胞外や細胞膜上の因子の影響をなくした上で、光合成活性を調べたが、WT との顕著な差は得られなかった。葉緑体包膜局在型輸送体は、細胞外 CA や細胞膜及び 4 枚の葉緑体包膜の無機炭素輸送の影響を受けるため、CE 局在の TpSLC4-2 を過剰発現しても差が見られなかったと考えられる。